



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類7 A61K 7/48, 7/00</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/51561</p> <p>(43) 国際公開日 2000年9月8日(08.09.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP00/01203</p> <p>(22) 国際出願日 2000年3月1日(01.03.00)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平11/53767 1999年3月2日(02.03.99) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 協和醗酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.)[JP/JP] 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 牧元 隆(MAKIMOTO, Yutaka)[JP/JP] 榊原敏弘(SAKAKIBARA, Toshihiro)[JP/JP] 〒194-8533 東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内 Tokyo, (JP) 小林麻子(KOBAYASHI, Asako)[JP/JP] 高星千恵美(TAKABOSHI, Chiemi)[JP/JP] 神村彩子(KAMIMURA, Ayako)[JP/JP] 高橋知也(TAKAHASHI, Tomoya)[JP/JP]</p>	<p>田島美菜子(TAJIMA, Minako)[JP/JP] 〒305-0841 茨城県つくば市御幸が丘2番地 協和醗酵工業株式会社 筑波研究所内 Ibaraki, (JP) 竹越与一郎(TAKEKOSHI, Yoichiro)[JP/JP] 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 協和醗酵工業株式会社 本社内 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	
<p>(54)Title: COSMETICS</p> <p>(54)発明の名称 化粧品</p> <p>(57) Abstract Skin aging resistors and/or skin property ameliorating agents which contain as the active ingredient hydroxyproline, an N-acyl derivative of hydroxyproline or its salt; and cosmetics for preventing skin aging and/or ameliorating skin properties which contain the above skin aging resistors and/or skin property ameliorating agents.</p>		

(57)要約

本発明は、ヒドロキシプロリンもしくはヒドロキシプロリンのN-アシル誘導体またはその塩を有効成分とする肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤並びに該肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤を含有する肌の老化抑制および／または肌質改善化粧料に関する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MC	モナコ	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MG	マダガスカル	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ			TR	トルコ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサウ	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	US	米国
CH	スイス	IE	アイルランド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MZ	モザンビーク	VN	ヴェトナム
CM	カメルーン	IN	インド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラヴィア
CN	中国	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CU	キューバ	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CY	キプロス	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク	KR	韓国				

## 明 細 書

### 化粧品

#### 技術分野

本発明は、肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤、並びに該肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤からなる肌の老化抑制および／または肌質改善用化粧品に関する。

#### 背景技術

従来より、しわ・たるみ・ドライスキン等のトラブルの原因である肌の老化や肌質の悪化の防止などの美容効果を得る目的で、老化防止素材が広く化粧料に配合されてきた。

化粧料に配合されている老化防止素材は、過酸化脂質抑制剤と細胞賦活剤に大別される。

過酸化脂質抑制作用のある素材としては、 $\alpha$ -ヒドロキシ酸、ビタミンA、 $\beta$ -カロチン、ビタミンB<sub>12</sub>、ビタミンE、また、プラルチン、プラトニンなどの色素類、オウゴン、ルチン、ゴマエキス、茶エキスなどがある。一方、細胞賦活剤としては、ムミネキス、グリコール酸、 $\gamma$ -アミノ酸、シアル酸、ローヤルゼリー、センブリエキス、トウヤク、高麗人参エキスなどが知られている。

細胞賦活剤としては、コラーゲン合成を促進する素材、肌質の改善作用のある素材等が知られている。

コラーゲン合成を促進するものとしては、トランスフォーミンググロースファクター  $\beta$  1、プレートレットドライブドグロースファクター、ベーシックファイブロblastグロースファクター、インシュリンライクグロースファクター1など各種グロースファクターおよびシルクプロテイン等が知られている。

肌質の改善作用のある素材としては、アラントイン、アロエ抽出物、人参抽出物、胎盤抽出物、牛血液除タンパク質、発酵代謝物等が知られている。

ヒドロキシプロリン誘導体がマウス肝臓破碎物の酸素消費量を増加させることより、肌の弾力性を保つことのできる化粧品として利用できるとの報告があるが（特開平1-131107）、マウス肝臓破碎物の酸素消費量の増加と肌に対する効果との関係、および化粧品としての有効性に関するデータは一切示されておらず、該報告からヒドロキシプロリンの誘導体が化粧品として有効であると結論づけることはできない。

これまでに、ヒドロキシプロリンまたはヒドロキシプロリンの誘導体が化粧品として有効であることを実証した報告はない。

保湿効果を増強させる目的で、ムチン（特開平5-339140）、あるいは、グリシンベタインとピロリドンカルボン酸またはその塩（特開平9-871262）等にアミノ酸を添加した化粧品の報告がある。該報告において、アミノ酸の例としてヒドロキシプロリンがあげられているが、ヒドロキシプロリンの化粧品としての効果に関するデータは一切示されていない。

このように、ヒドロキシプロリンまたはヒドロキシプロリンの誘導体の、化粧品分野における肌に対する機能および効果は不明である。

ヒドロキシプロリンおよびヒドロキシプロリンのN-アシル誘導体が表皮細胞の増殖を促進する活性、繊維芽細胞におけるコラーゲンの合成を促進する活性を有することは知られておらず、該活性を利用した化粧料は知られていない。

更に、微生物を用いて製造したヒドロキシプロリンを用いた化粧品はこれまでに知られていない。

#### 発明の開示

本発明の目的は、肌の老化抑制作用および／または肌質改善作用を有する表皮細胞の増殖促進剤、繊維芽細胞のコラーゲン合成促進剤、表皮の水分保持機能向上剤等の肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤、並びに該肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤を含有する肌の老化抑制および／または肌質改善化粧料を提供することにある。

本発明の目的は、ヒドロキシプロリンもしくはヒドロキシプロリンのN-アシル誘導体またはその塩を有効成分とする肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤を肌に塗布することからなる肌の老化抑制および／または肌質改善方法を提供することである。

本発明の目的は、ヒドロキシプロリンもしくはヒドロキシプロリンのN-アシル誘導体またはその塩を含有する肌の老化抑制および／または肌質改善化粧料を肌に塗布することからなる肌の老化抑制および／または肌質改善方法を提供することである。

本発明の目的は、肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤を製造するためのヒドロキシプロリンもしくはヒドロキシプロリンのN-アシル誘導体またはその塩の使用を提供することである。

本発明の目的は、肌の老化抑制および／または肌質改善化粧料を製造するためのヒドロキシプロリンもしくはヒドロキシプロリンのN-アシル誘導体またはその塩の使用を提供することである。

本発明の目的は、肌の老化抑制および／または肌質改善のためのヒドロキシプロリンもしくはヒドロキシプロリンのN-アシル誘導体またはその塩の使用を提供することである。

本発明者らは、保湿効果、肌への老化抑制作用および肌質改善作用を有する、安全性の高い化粧料に関し、鋭意検討した結果、ヒドロキシプロリンあるいはそのN-アシル誘導体に効果を見出し本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は以下(1)～(68)に関する。

(1) ヒドロキシプロリンもしくはヒドロキシプロリンのN-アシル誘導体またはその塩を有効成分とする肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤。

(2) ヒドロキシプロリンまたはヒドロキシプロリンのN-アシル誘導体を全重量に対し0.01～5重量%含有することを特徴とする、上記(1)記載の肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤。

(3) ヒドロキシプロリンのN-アシル誘導体が、N-アセチル化誘導体またはN-プロピオニル化誘導体である、上記(1)または(2)記載の肌の老化抑制剤および/または肌質改善剤。

(4) ヒドロキシプロリンが、シス-4-ヒドロキシ-L-プロリン、シス-4-ヒドロキシ-D-プロリン、シス-3-ヒドロキシ-L-プロリン、シス-3-ヒドロキシ-D-プロリン、トランス-4-ヒドロキシ-L-プロリン、トランス-4-ヒドロキシ-D-プロリン、トランス-3-ヒドロキシ-L-プロリンおよびトランス-3-ヒドロキシ-D-プロリンからなる群より選ばれるヒドロキシプロリンである、上記(1)～(3)記載いずれかに記載の肌の老化抑制剤および/または肌質改善剤。

(5) ヒドロキシプロリンが、微生物により生産されたヒドロキシプロリンである、上記(1)～(4)いずれかに記載の肌の老化抑制剤および/または肌質改善剤。

(6) 微生物が、アミコラトプシス属、ダクチロスボランジウム属およびストレプトマイセス属から選ばれる属に属する微生物由来のプロリン3位水酸化酵素またはプロリン4位水酸化酵素遺伝子を導入された微生物である、上記(5)記載の肌の老化抑制剤および/または肌質改善剤。

(7) 肌の老化抑制剤および/または肌質改善剤が、表皮細胞の増殖促進剤である上記(1)～(6)のいずれかに記載の肌の老化抑制剤および/または肌質改善剤。

(8) 肌の老化抑制剤および/または肌質改善剤が、繊維芽細胞のコラーゲン合成促進剤である上記(1)～(6)のいずれかに記載の肌の老化抑制剤および/または肌質改善剤。

(9) 肌の老化抑制剤および/または肌質改善剤が、表皮の水分保持機能向上剤である上記(1)～(6)のいずれかに記載の肌の老化抑制剤および/または肌質改善剤。

(10) 肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤が、しわ形成抑制または改善剤である上記(1)～(6)のいずれかに記載の肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤。

(11) 肌がヒトの肌である上記(1)～(10)のいずれかに記載の肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤。

(12) 上記(1)～(11)のいずれかに記載の肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤を含有する肌の老化抑制および／または肌質改善化粧料。

(13) ヒドロキシプロリンもしくはヒドロキシプロリンのN-アシル誘導体またはその塩が、N-アセチルヒドロキシプロリンまたはその塩である上記(12)記載の化粧料。

(14) 化粧料にレシチン、リゾレシチンおよびヒアルロン酸からなる群より選ばれる一種又は二種以上の成分を含有する上記(12)または(13)記載の化粧料。

(15) ヒドロキシプロリンもしくはヒドロキシプロリンのN-アシル誘導体またはその塩を有効成分とする肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤を肌に塗布することからなる肌の老化抑制および／または肌質改善方法。

(16) 肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤中にヒドロキシプロリンまたはヒドロキシプロリンのN-アシル誘導体を0.01～5重量%含有する上記(15)記載の肌の老化抑制および／または肌質改善方法。

(17) ヒドロキシプロリンのN-アシル誘導体が、N-アセチル誘導体またはN-プロピオニル誘導体である、上記(15)または(16)記載の肌の老化抑制および／または肌質改善方法。

(18) ヒドロキシプロリンが、シス-4-ヒドロキシ-L-プロリン、シス-4-ヒドロキシ-D-プロリン、シス-3-ヒドロキシ-L-プロリン、シス-3-ヒドロキシ-D-プロリン、トランス-4-ヒドロキシ-L-プロリン、トランス-4-ヒドロキシ-D-プロリン、トランス-3-ヒドロキシ

ーL-プロリンおよびトランス-3-ヒドロキシ-D-プロリンからなる群より選ばれるヒドロキシプロリンである、上記(15)～(17)記載いずれかに記載の肌の老化抑制および／または肌質改善方法。

(19) ヒドロキシプロリンが、微生物により生産されたヒドロキシプロリンである、上記(15)～(18)いずれかに記載の肌の老化抑制および／または肌質改善方法。

(20) 微生物が、アミコラトプシス属、ダクチロスポランジウム属およびストレプトマイセス属から選ばれる属に属する微生物由来のプロリン3位水酸化酵素またはプロリン4位水酸化酵素遺伝子を導入された微生物である、上記(19)記載の肌の老化抑制および／または肌質改善方法。

(21) 肌の老化抑制および／または肌質改善方法が、表皮細胞の増殖促進方法である上記(15)～(20)のいずれかに記載の肌の老化抑制および／または肌質改善方法。

(22) 肌の老化抑制および／または肌質改善方法が、繊維芽細胞のコラーゲン合成促進方法である上記(15)～(20)のいずれかに記載の肌の老化抑制および／または肌質改善方法。

(23) 肌の老化抑制および／または肌質改善方法が、表皮の水分保持機能向上方法である上記(15)～(20)のいずれかに記載の肌の老化抑制および／または肌質改善方法。

(24) 肌の老化抑制および／または肌質改善方法が、しわ形成抑制または改善方法である上記(15)～(20)のいずれかに記載の肌の老化抑制および／または肌質改善方法。

(25) 肌がヒトの肌である上記(15)～(24)のいずれかに記載の肌の老化抑制および／または肌質改善方法。

(26) ヒドロキシプロリンもしくはヒドロキシプロリンのN-アシル誘導体またはその塩を含有する肌の老化抑制および／または肌質改善化粧料を



肌に塗布することからなる肌の老化抑制および／または肌質改善方法。

(27) 肌の老化抑制および／または肌質改善用化粧料中にヒドロキシプロリンまたはヒドロキシプロリンのN-アシル誘導体を0.01～5重量%含有する上記(26)記載の肌の老化抑制および／または肌質改善方法。

(28) ヒドロキシプロリンのN-アシル誘導体が、N-アセチル化誘導体またはN-プロピオニル化誘導体である、上記(26)または(27)記載の肌の老化抑制および／または肌質改善方法。

(29) ヒドロキシプロリンが、シス-4-ヒドロキシ-L-プロリン、シス-4-ヒドロキシ-D-プロリン、シス-3-ヒドロキシ-L-プロリン、シス-3-ヒドロキシ-D-プロリン、トランス-4-ヒドロキシ-L-プロリン、トランス-4-ヒドロキシ-D-プロリン、トランス-3-ヒドロキシ-L-プロリンおよびトランス-3-ヒドロキシ-D-プロリンからなる群より選ばれるヒドロキシプロリンである、上記(26)～(28)記載いずれかに記載の肌の老化抑制および／または肌質改善方法。

(30) ヒドロキシプロリンが、微生物により生産されたヒドロキシプロリンである、上記(26)～(29)いずれかに記載の肌の老化抑制および／または肌質改善方法。

(31) 微生物が、アミコラトプシス属、ダクチロスポランジウム属およびストレプトマイセス属から選ばれる属に属する微生物由来のプロリン3位水酸化酵素またはプロリン4位水酸化酵素遺伝子を導入された微生物である、上記(30)記載の肌の老化抑制および／または肌質改善方法。

(32) 肌の老化抑制および／または肌質改善方法が、表皮細胞の増殖促進方法である上記(26)～(31)のいずれかに記載の肌の老化抑制および／または肌質改善方法。

(33) 肌の老化抑制および／または肌質改善方法が、繊維芽細胞のコラーゲン合成促進方法である上記(26)～(31)のいずれかに記載の肌の老

化抑制および／または肌質改善方法。

(34) 肌の老化抑制および／または肌質改善方法が、表皮の水分保持機能向上方法である上記(26)～(31)のいずれかに記載の肌の老化抑制および／または肌質改善方法。

(35) 肌の老化抑制および／または肌質改善方法が、しわ形成抑制または改善方法である上記(26)～(31)のいずれかに記載の肌の老化抑制および／または肌質改善方法。

(36) 肌がヒトの肌である上記(26)～(35)のいずれかに記載の肌の老化抑制および／または肌質改善方法。

(37) 肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤を製造するためのヒドロキシプロリンもしくはヒドロキシプロリンのN-アシル誘導体またはその塩の使用。

(38) 肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤中にヒドロキシプロリンまたはヒドロキシプロリンのN-アシル誘導体を0.01～5重量%含有する上記(37)記載の使用。

(39) ヒドロキシプロリンのN-アシル誘導体が、N-アセチル化誘導体またはN-プロピオニル化誘導体である、上記(37)または(38)記載の使用。

(40) ヒドロキシプロリンが、シス-4-ヒドロキシ-L-プロリン、シス-4-ヒドロキシ-D-プロリン、シス-3-ヒドロキシ-L-プロリン、シス-3-ヒドロキシ-D-プロリン、トランス-4-ヒドロキシ-L-プロリン、トランス-4-ヒドロキシ-D-プロリン、トランス-3-ヒドロキシ-L-プロリンおよびトランス-3-ヒドロキシ-D-プロリンからなる群より選ばれるヒドロキシプロリンである、上記(37)～(39)のいずれかに記載の使用。

(41) ヒドロキシプロリンが、微生物により生産されたヒドロキシプロ

リンである、上記（３７）～（４０）のいずれかに記載の使用。

（４２） 微生物が、アミコラトプシス属、ダクチロスポランジウム属およびストレプトマイセス属から選ばれる属に属する微生物由来のプロリン３位水酸化酵素またはプロリン４位水酸化酵素遺伝子を導入された微生物である、上記（４１）記載の使用。

（４３） 肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤が、表皮細胞の増殖促進剤である上記（３７）～（４２）のいずれかに記載の使用。

（４４） 肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤が、繊維芽細胞のコラーゲン合成促進剤である上記（３７）～（４２）のいずれかに記載の使用。

（４５） 肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤が、表皮の水分保持機能向上剤である上記（３７）～（４２）のいずれかに記載の使用。

（４６） 肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤が、しわ形成抑制剤または改善剤である上記（３７）～（４２）のいずれかに記載の使用。

（４７） 肌がヒトの肌である上記（３７）～（４６）のいずれかに記載の使用。

（４８） 肌の老化抑制および／または肌質改善用化粧料を製造するためのヒドロキシプロリンもしくはヒドロキシプロリンのＮ－アシル誘導体またはその塩の使用。

（４９） ヒ肌の老化抑制および／または肌質改善用化粧料中にドロキシプロリンまたはヒドロキシプロリンのＮ－アシル誘導体を０．０１～５重量％含有する上記（４８）記載の使用。

（５０） ヒドロキシプロリンのＮ－アシル誘導体が、Ｎ－アセチル化誘導体またはＮ－プロピオニル化誘導体である、上記（４８）または（４９）記載の使用。

（５１） ヒドロキシプロリンが、シス－４－ヒドロキシ－Ｌ－プロリン、シス－４－ヒドロキシ－Ｄ－プロリン、シス－３－ヒドロキシ－Ｌ－プロリン、

シス-3-ヒドロキシ-D-プロリン、トランス-4-ヒドロキシ-L-プロリン、トランス-4-ヒドロキシ-D-プロリン、トランス-3-ヒドロキシ-L-プロリンおよびトランス-3-ヒドロキシ-D-プロリンからなる群より選ばれるヒドロキシプロリンである、上記(48)～(50)のいずれかに記載の使用。

(52) ヒドロキシプロリンが、微生物により生産されたヒドロキシプロリンである、上記(48)～(51)のいずれかに記載の使用。

(53) 微生物が、アミコラトプシス属、ダクチロスポランジウム属およびストレプトマイセス属から選ばれる属に属する微生物由来のプロリン3位水酸化酵素またはプロリン4位水酸化酵素遺伝子を導入された微生物である、上記(52)記載の使用。

(54) 肌の老化抑制および／または肌質改善が、表皮細胞の増殖促進である上記(48)～(53)のいずれかに記載の使用。

(55) 肌の老化抑制および／または肌質改善が、繊維芽細胞のコラーゲン合成促進である上記(48)～(53)のいずれかに記載の使用。

(56) 肌の老化抑制および／または肌質改善が、表皮の水分保持機能向上である上記(48)～(53)のいずれかに記載の使用。

(57) 肌の老化抑制および／または肌質改善が、しわ形成抑制剤または改善剤である上記(48)～(53)のいずれかに記載の使用。

(58) 肌がヒトの肌である上記(48)～(57)のいずれかに記載の使用。

(59) 肌の老化抑制および／または肌質改善のためのヒドロキシプロリンもしくはヒドロキシプロリンのN-アシル誘導体またはその塩の使用。

(60) ヒドロキシプロリンのN-アシル誘導体が、N-アセチル化誘導体またはN-プロピオニル化誘導体である、上記(59)記載の使用。

(61) ヒドロキシプロリンが、シス-4-ヒドロキシ-L-プロリン、

シス-4-ヒドロキシ-D-プロリン、シス-3-ヒドロキシ-L-プロリン、シス-3-ヒドロキシ-D-プロリン、トランス-4-ヒドロキシ-L-プロリン、トランス-4-ヒドロキシ-D-プロリン、トランス-3-ヒドロキシ-L-プロリンおよびトランス-3-ヒドロキシ-D-プロリンからなる群より選ばれるヒドロキシプロリンである、上記(59)または(60)に記載の使用。

(62) ヒドロキシプロリンが、微生物により生産されたヒドロキシプロリンである、上記(59)～(61)のいずれかに記載の使用。

(63) 微生物が、アミコラトプシス属、ダクチロスポランジウム属およびストレプトマイセス属から選ばれる属に属する微生物由来のプロリン3位水酸化酵素またはプロリン4位水酸化酵素遺伝子を導入された微生物である、上記(62)に記載の使用。

(64) 肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤が、表皮細胞の増殖促進剤である上記(59)～(63)のいずれかに記載の使用。

(65) 肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤が、繊維芽細胞のコラーゲン合成促進剤である上記(59)～(63)のいずれかに記載の使用。

(66) 肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤が、表皮の水分保持機能向上剤である上記(59)～(63)のいずれかに記載の使用。

(67) 肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤が、しわ形成抑制剤または改善剤である上記(59)～(63)のいずれかに記載の使用。

(68) 肌がヒトの肌である上記(59)～(67)のいずれかに記載の使用。

本発明の肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤とは、肌の老化抑制作用または肌質改善作用を有するもの、あるいは、肌の老化抑制作用と肌質改善作用の両方の作用を有するものを意味する。

本発明に使用するヒドロキシプロリンは、プロリンがD体かL体か、また水

酸基の位置が3位か4位か、およびその立体異性体がシスカトランスかによって、8種類の立体異性体があるが、いずれでも用いる。具体的ヒドロキシプロリンとしては、シス-4-ヒドロキシ-L-プロリン、シス-4-ヒドロキシ-D-プロリン、シス-3-ヒドロキシ-L-プロリン、シス-3-ヒドロキシ-D-プロリン、トランス-4-ヒドロキシ-L-プロリン、トランス-4-ヒドロキシ-D-プロリン、トランス-3-ヒドロキシ-L-プロリンおよびトランス-3-ヒドロキシ-D-プロリンがあげられる。

ヒドロキシプロリンは、コラーゲン中の主要構成アミノ酸成分として、また、エラスチンの構成アミノ酸として自然界に広く存在するアミノ酸の一種であり、例えばブタやウシ等の動物由来のコラーゲンを酸加水分解し、常法により精製することにより製造することができる。

トランス-4-ヒドロキシ-L-プロリンは、アミコラトブシス (Amycolatopsis) 属またはダクチロスポランジウム (Dactylosporangium) 属より単離したプロリン4位水酸化酵素 (特開平7-313179号公報) を用い製造することができる。またシス-3-ヒドロキシ-L-プロリンは、ストレプトマイセス (Streptomyces) 属より単離したプロリン3位水酸化酵素 (特開平7-322885号公報) を用い製造することができる〔バイオインダストリー, 14, 31 (1997)〕。

本発明においては、微生物を用いて製造したヒドロキシプロリンがより品質の優れたものが容易に得られる点で好ましい。

本発明で用いるヒドロキシプロリンのN-アシル誘導体としては、上述の各種ヒドロキシプロリンの立体異性体のN-アシル誘導体があげられる。該N-アシル誘導体のアシル基としては、特に制限がないが、好ましくは炭素数1~24、より好ましくは炭素数1~12、特に好ましくは炭素数1~6のアシル基があげられ、具体的にはホルミル、アセチル、プロピオニル、ブチリル、イソブチリル、バレリル、ピバロイル、ヘキサノイル、ヘプタノイル、オクタノ

イル、ノナノイル、デカノイル、ウンデカノイル、ドデカノイル等をあげることができる。

ヒドロキシプロリンもしくはヒドロキシプロリンのN-アシル誘導体の塩としては、ナトリウム、カリウム、リチウム等のアルカリ金属塩、カルシウム、マグネシウム等のアルカリ土類金属塩、アンモニウム塩、モノエタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、トリイソプロパノールアミンなどのアミンの付加塩およびアルギニン、リジン等の塩基性アミノ酸の付加塩などがあげられる。

ヒドロキシプロリンのN-アシル誘導体は、公知の方法により調製することができる。例えば、ヒドロキシプロリンのN-アシル誘導体は、直鎖または分岐状の炭素数1～24の飽和または不飽和の脂肪酸を塩化チオニル、ホスゲン等のハロゲン化剤を用いてクロライド、ブロマイド等のハロゲン化物に変換した後、前述のヒドロキシプロリンと縮合させるか、または脂肪酸を酸無水物に変換した後、ヒドロキシプロリンと反応させることにより製造することができる。

脂肪酸としては、例えばギ酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸、イソ酪酸、吉草酸、イソ吉草酸、ピバル酸、ヘキサン酸、ヘプタン酸、オクタン酸、ノナン酸、デカン酸、ウンデカン酸、ドデカン酸等の脂肪酸を単独もしくは組合したものゝがあげられる。

酸ハロゲン化物を経由するヒドロキシプロリンのN-アシル誘導体の製造方法を、以下に例示する。

脂肪酸を塩化メチレン、クロロホルム、四塩化炭素、ベンゼン、トルエン、キシレン、n-ヘキサン等の溶媒中に分散し、これに1～5倍当量のハロゲン化剤を添加して反応させ、脂肪酸ハライドを得る。次に、ヒドロキシプロリンを溶媒に溶解または分散させ、得られた溶液を5～70℃に保ちながら、上記の脂肪酸ハライドをヒドロキシプロリン対して0.3～3.0倍当量加え、ア

シル化反応を行うことによりヒドロキシプロリンのN-アシル誘導体を製造することができる。

アシル化反応に用いられる溶媒としては、水、メタノール、エタノール、イソプロパノール、イソブタノール、アセトン、トルエン、テトラヒドロフラン、酢酸エチル、N, N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド等があげられ、これらは単独あるいは混合して用いてもよい。ヒドロキシプロリンを溶媒に溶解または分散する際、ヒドロキシプロリンに対して0.8~2.0倍当量の水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等のアルカリ物質を必要に応じて溶媒に溶解または分散させてもよい。

ヒドロキシプロリンのN-アシル誘導体の塩を取得したいとき、ヒドロキシプロリンのN-アシル誘導体が塩の形で得られる場合には、そのまま精製すればよく、遊離の形で得られる場合には、適当な溶媒に溶解または懸濁し、塩基を加えて塩を形成させればよい。

精製は、例えば結晶化、クロマトグラフィー等の通常の方法が用いられる。

本発明の肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤およびそれを含有する肌の老化抑制および／または肌質改善化粧料において、シス／トランス-4-ヒドロキシ-L/D-プロリン、シス／トランス-3-ヒドロキシ-L/D-プロリン、もしくはこれらのN-アシル誘導体またはその塩を、単独または混合して用いることができる。

これらヒドロキシプロリンもしくはヒドロキシプロリンのN-アシル誘導体またはその塩の肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤並びに化粧料中の含有量は目的とする効果に応じて広い範囲で増減することができる。これら化合物の肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤並びに化粧料中の含有量としては、例えば、0.01~5重量%をあげることができ、好ましくは0.1~5重量%、特に好ましくは0.5~3重量%である。

本発明において、肌の老化抑制作用および／または肌質改善作用とは、例え



ば表皮細胞の増殖促進作用、繊維芽細胞のコラーゲン合成促進作用、表皮の水分保持機能向上作用、しわ形成抑制もしくは改善作用等が例示されるがこれに限定されるものではない。また、肌としては、マウス、イヌ、ネコ、ウマ等の愛玩動物等及びヒトの肌が例示でき、ヒト肌が好ましい。

また、繊維芽細胞のコラーゲン合成促進剤、表皮の水分保持機能向上剤としては、ヒドロキシプロリンのN-アシル誘導体が好ましく、N-アセチルヒドロキシプロリンがより好ましい。

本発明の肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤並びに肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤からなる肌の老化抑制および／または肌質改善化粧料には、上記必須成分に加え、必要に応じて通常化粧料に配合される成分を含有してもよい。

配合成分としては、例えば、固形油、半固形油、他の保湿剤、エモリエント剤、水溶性高分子、油溶性高分子、各種界面活性剤、無機および有機顔料、シリコーンまたはフッ素化合物で処理された無機および有機顔料、有機染料等の色剤、エタノール、紫外線吸収剤、防腐剤、酸化防止剤、色素、増粘剤、pH調整剤、香料、血行促進剤、冷感剤、制汗剤、殺菌剤、肌柔軟剤、水等をあげることができ、本発明の目的、効果を損なわない質的、量的範囲内で含有可能である。

固形・半固形油としては、ワセリン、ラノリン、セレシン、マイクロクリスタリンワックス、カルナバロウ、キャンデリラロウ；椰子油脂肪酸、ラウリン酸、硬化牛脂脂肪酸等の高級脂肪酸；ラウリルアルコール、セチルアルコール、ステアリルアルコール、ベヘニルアルコール等の高級アルコール等をあげることができる。

液体油としては、例えばアボガド油、オリーブ油、ホホバ油等の植物油；オレイン酸、イソステアリン酸等の脂肪酸；ヘキサデシルアルコール、オレイルアルコール等のアルコール類；2-エチルヘキサン酸セチル、ミリスチン酸-

2-オクチルドデシル、ジ-2-エチルヘキサン酸ネオペンチルグリコール、トリ-2-エチルヘキサン酸グリセロール、オレイン酸-2-オクチルドデシル、ミリスチン酸イソプロピル、トリイソステアリン酸グリセロール、2-エチルヘキサン酸ジグリセリド、長鎖アシルグルタミン酸オクチルドデシルエステル等のエステル油；ジメチルポリシロキサン、メチルハイドロジェンポリシロキサン、メチルフェニルポリシロキサン、オクタメチルシクロテトラシロキサン等のシリコン油等；流動パラフィン、スクワレン、スクワラン等の液状炭化水素油等をあげることができる。

保湿剤としては、脂溶性保湿剤、低分子保湿剤および高分子保湿剤をあげることができる。

脂溶性保湿剤としては、例えば、リゾレシチン、レシチン、コレステロール、コレステロールエステル、スフィンゴ脂質、セラミド等をあげることができる。

低分子保湿剤としては、セリン、グルタミン、ソルビトール、マンニトール、グリセリン、ピロリドン-カルボン酸ナトリウム、1,3-ブチレングリコール、プロピレングリコール、乳酸、乳酸塩等をあげることができる。

高分子保湿剤としては、ヒアルロン酸、ヒアルロン酸ナトリウム、エラスチン、アルギン酸、ムコ多糖類、ポリエチレングリコール、ポリアスパラギン酸塩、水溶性キチン等をあげることができる。

エモリエント剤としては、例えば長鎖アシルグルタミン酸コレステリルエステル、ヒドロキシステアリン酸コレステリル、1,2-ヒドロキシステアリン酸、ステアリン酸、ロジン酸、ラノリン脂肪酸コレステリルエステル等をあげることができる。

界面活性剤としては、例えばポリオキシエチレン（POEと略記する）セチルエーテル、POEステアリン酸エステル、POEソルビタンモノラウレート、グリセリン脂肪酸エステル、ポリグリセリン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油等の非イオン界面活性剤；塩化ベンザルコニウム、塩化ステ

アリルトリメチルアンモニウム、塩化ジセチルジメチルアンモニウム、塩化ベヘニルトリメチルアンモニウム等のカチオン界面活性剤；2-ココイル-N-カルボキシメチル-N-ヒドロキシエチルイミダゾリニウムベタイン、アミド酢酸ベタイン等の両性界面活性剤；高級アルコール硫酸塩、高級アルコールエーテル硫酸塩、長鎖脂肪酸アルカリ金属塩、長鎖脂肪酸アルカリ土類金属塩、長鎖脂肪酸塩基性アミノ酸塩、N-長鎖アシルアミノ酸、N-長鎖アシルアミノ酸塩等のアニオン界面活性剤をあげることができる。

水溶性高分子としては、例えばカルボキシメチルセルロース、メチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、トランガントガム、カラギーナン、デキストリン、デキストリン脂肪酸エステル、カルボキシビニルポリマー、キサンタンガム、ゼラチン、アルギン酸ナトリウム、アラビアゴム等の化粧料に汎用される水溶性高分子をあげることができる。

油溶性高分子としてはポリビニルピロリドン・エイコセン共重合体、ポリビニルピロリドン・ヘキサデセン共重合体、ニトロセルロース、高分子シリコーン等の化粧料に汎用される油溶性高分子をあげることができる。

有機および無機顔料としては、例えばケイ酸、無水ケイ酸、ケイ酸マグネシウム、タルク、セリサイト、マイカ、カオリン、ベンカラ、クレイ、ペントナイト、チタン被膜雲母、オキシ塩化ビスマス、酸化ジルコニウム、酸化マグネシウム、酸化亜鉛、酸化チタン、酸化アルミニウム、硫酸カルシウム、硫酸バリウム、硫酸マグネシウム、炭酸カルシウム、炭酸マグネシウム、酸化鉄、群青、酸化クロム、水酸化クロム、カラミンおよびカーボンブラックおよびこれらの複合体等の無機粉体；ポリアミド、ポリエステル、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリウレタン、ビニル樹脂、尿素樹脂、フェノール樹脂、フッ素樹脂、ケイ素樹脂、アクリル樹脂、メラミン樹脂、エポキシ樹脂、ポリカーボネート樹脂、ジビニルベンゼン・スチレン共重合体、シルクパウダー、セルロー

ス、CIピグメントイエロー、CIピグメントオレンジ等の有機粉体；およびこれらの無機粉体と有機粉体の複合粉体等をあげることができる。

有機粉体としては、ステアリン酸カルシウム等の金属石鹸；セチルリン酸亜鉛ナトリウム、ラウリルリン酸亜鉛、ラウリルリン酸カルシウム等のアルキルリン酸多価金属塩；N-ラウロイル- $\beta$ -アラニンカルシウム、N-ラウロイル- $\beta$ -アラニン亜鉛、N-ラウロイルグリシンカルシウム等のアシルアミノ酸多価金属塩；N-ラウロイル-タウリンカルシウム、N-パルミトイル-タウリンカルシウム等のアミドスルホン酸多価金属塩；N $^{\epsilon}$ -ラウロイル-L-リジン、N $^{\epsilon}$ -パルミトイルリジン、N $^{\alpha}$ -パルミトイルオルニチン、N $^{\alpha}$ -ラウロイルアルギニン、N $^{\alpha}$ -硬化牛脂脂肪酸アシルアルギニン等のN-アシル塩基性アミノ酸；N-ラウロイルグリシルグリシン等のN-アシルポリペプチド； $\alpha$ -アミノカプリル酸、 $\alpha$ -アミノラウリン酸等の $\alpha$ -アミノ脂肪酸；ポリエチレン、ポリプロピレン、ナイロン、ポリメチルメタクリレート、ポリスチレン、ジビニルベンゼン・スチレン共重合体、四フッ化エチレン等の樹脂粉体等を用いることができる。

紫外線吸収剤としては、例えばパラアミノ安息香酸、パラジメチルアミノ安息香酸オクチル等のパラアミノ安息香酸誘導体；2-ヒドロキシ-4-メトキシベンゾフェノン、ジヒドロキシジメトキシベンゾフェノン等のベンゾフェノン誘導体；パラメトキシ桂皮酸エチル、パラメトキシ桂皮酸オクチル等のメトキシ桂皮酸誘導体；サリチル酸オクチル、サリチル酸ホモメンチル等のサリチル酸誘導体；N-ベンゾイル-O-メチル- $\alpha$ -デヒドロチロシン2-エチルヘキシルエステル等の $\alpha$ -デヒドロアミノ酸誘導体；4-(3,4-ジメトキシフェニル)メチレン-2,5-ジオキソ-1-イミダゾリジンプロピオン酸2-エチルヘキシルエステル等のベンザールヒダントイン誘導体；ウロカニン酸、ウロカニン酸エチル、4-tert-ブチル-4'-メトキシジベンゾイルメタン、2-(2'-ヒドロキシ-5'-メチルフェニル)ベンゾトリアゾ

ール等をあげることができる。

防腐剤としては、メチルパラベン等をあげることができる。

肌柔軟剤としては、流動パラフィン、ワセリン、オリーブ油、スクワラン、ラノリン、合成エステル油等をあげることができる。

上記いずれの成分も、本発明の目的、効果を損なわない範囲内で配合可能であるが、好ましくは0.01～5重量%であり、特に好ましくは0.01～3重量%である。

本発明における表皮細胞の増殖促進剤、繊維芽細胞のコラーゲン合成促進剤、表皮の水分保持機能向上剤、しわ形成抑制もしくは改善剤等の肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤並びに化粧料は、溶液、乳化物、練り状混合物等の形態をとることが可能である。

また、本発明における該肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤からなる肌の老化抑制および／または肌質改善用化粧料には、洗顔クリーム、洗顔フォーム、クレンジングクリーム、クレンジングミルク、クレンジングローション、マッサージクリーム、コールドクリーム、モイスチャークリーム、乳液、化粧水、パック、アフターシェービングクリーム、日焼け止めクリーム、日焼け用オイル、ボディシャンプー、ヘアシャンプー、ヘアリンス、ヘアトリートメント、養毛料、育毛料、チック、ヘアクリーム、ヘアリキッド、セットローション、ヘアスプレー、ヘアダイ、ヘアブリーチ、カラーリンス、カラスプレー、パーマメントウェーブ液、プレスパウダー、ルースパウダー、アイシャドウ、ハンドクリーム等が含まれる。

また、肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤並びに該肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤からなる肌の老化抑制および／または肌質改善用化粧料の形態としては、特に、限定されず、例えば、乳液、クリーム、化粧水、パック、ファンデーション、毛髪化粧料等とすることができる。

本発明の肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤並びに該肌の老化抑制剤

および／または肌質改善剤からなる肌の老化抑制および／または肌質改善用化粧料の使用方法は年齢、個人、使用する部位により異なるが、ヒドロキシプロリンもしくはヒドロキシプロリンのN-アシル誘導体またはその塩を有する化粧料の濃度が0.01～5重量%、好ましくは0.1～5重量%、特に好ましくは0.5～3重量%であるものを0.1～5 $\mu$ l、好ましくは1～5 $\mu$ l、特に好ましくは2 $\mu$ lを1日1回～数回、肌に塗布することが望ましいがこれに限定されるものではない。

次に、実施例を挙げ本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれらになんら制約されるものではない。

#### 発明を実施するための最良の形態

##### 実施例1 トランス-4-ヒドロキシ-L-プロリン含有化粧料の調製

精製水にトランス-4-ヒドロキシ-L-プロリン（以下、Hypと略すこともある、協和発酵工業社製） 0.5重量%、メチルパラベン 0.1重量%およびグリセロール 0.17重量%添加し、混合融解することによりHyp含有化粧料（化粧料1）を調製した。

##### 実施例2 トランス-4-ヒドロキシ-L-プロリン含有化粧料の調製

精製水にHyp 3重量%、メチルパラベン 0.1重量%およびグリセロール 0.17重量%添加し、混合融解することによりHyp含有化粧料（化粧料2）を調製した。

##### 実施例3 N-アセチル-トランス-4-ヒドロキシ-L-プロリン含有化粧料の調製

精製水にN-アセチル-トランス-4-ヒドロキシ-L-プロリン（以下、N-Acetyl-Hypと略すこともある、協和発酵工業社製） 3重量%、メチルパラベン 0.1重量%およびグリセロール 0.17重量%添加し、混合融解することによりN-Acetyl-Hyp含有化粧料（化粧料3）を調製した。

##### 実施例4 コラーゲン含有化粧料の調製

精製水にコラーゲン（コラーゲンCLR、寿ケミカル） 1重量%、メチルパラベン 0.1重量%およびグリセロール 0.17重量%添加し、混合融解することによりコラーゲン含有化粧料（化粧料4）を調製した。

実施例5 トランス-4-ヒドロキシ-L-プロリンおよびレシチン含有化粧料の調製

精製水にHyp 0.5重量%、レシチン〔SLP-ホワイトH、ツル-レシチン工業社製〕 0.05重量%、ヒアルロン酸（ヒアルロン酸LP、協和発酵工業社製） 0.01重量%、メチルパラベン 0.1重量%およびグリセロール 0.17重量%添加し、混合融解することによりHypおよびレシチン含有化粧料（化粧料5）を調製した。

実施例6 トランス-4-ヒドロキシ-L-プロリンおよびリゾレシチン含有化粧料の調製

精製水にHyp 3重量%、リゾレシチン〔リゾレシチン協和、協和発酵工業社製〕 0.05重量%、ヒアルロン酸（ヒアルロン酸LP、協和発酵工業社製） 0.01重量%、メチルパラベン 0.1重量%およびグリセロール 0.17重量%添加し、混合融解することによりHypおよびレシチン含有化粧料（化粧料6）を調製した。

実施例7 トランス-4-ヒドロキシ-L-プロリンおよびレシチン含有化粧料の調製

精製水にHyp 3重量%、レシチン〔PC92H、ツル-レシチン工業社製〕 0.05重量%、ヒアルロン酸（ヒアルロン酸LP、協和発酵工業社製） 0.01重量%、メチルパラベン 0.1重量%およびグリセロール 0.17重量%添加し、混合融解することによりHypおよびレシチン含有化粧料（化粧料7）を調製した。

実施例8 トランス-4-ヒドロキシ-L-プロリンおよびレシチン含有化粧料の調製

精製水にHyp 3重量%、レシチン（SLP-ホワイトH、ツルーレシチン工業社製）0.05重量%、ヒアルロン酸（ヒアルロン酸LP、協和発酵工業社製）0.01重量%、メチルパラベン 0.1重量%およびグリセロール 0.17重量%添加し、混合融解することによりHypおよびレシチン含有化粧品（化粧品8）を調製した。

以上、実施例1～8で調製した化粧品の組成を第1表にまとめて示す。

第1表 化粧品の組成

組成成分（重量%）	化粧品							
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
Hyp	0.5	3	-	-	0.5	3	3	3
N-Acetyl-Hyp	-	-	3	-	-	-	-	-
コラーゲン	-	-	-	1	-	-	-	-
レシチン SLP	-	-	-	-	0.05	-	-	0.05
レシチン PC92	-	-	-	-	-	-	0.05	-
リゾレシチン	-	-	-	-	-	0.05	-	-
ヒアルロン酸	-	-	-	-	0.01	0.01	0.01	0.01
メチルパラベン	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
グリセロール	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17

Hyp：トランス-4-ヒドロキシ-L-プロリン

N-Acetyl-Hyp：N-アセチル-トランス-4-ヒドロキシ-L-プロリン

レシチン SLP：レシチン〔SLP-ホワイトH、ツルーレシチン工業（株）〕

レシチン PC92：レシチン〔PC92H、ツルーレシチン工業（株）〕

#### 実施例9 ヒト繊維芽細胞におけるコラーゲン合成促進活性

合成コラーゲンの測定は、「コラーゲン実験法」（永井ら著、講談社サイエンスティフィク）に準じ、以下の方法で行った。

ヒト新生児由来繊維芽細胞（三光純薬社製）を、10%牛胎児血清を添加したDMEM培地〔Virology, 8, 396 (1959)〕を用い、37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件で定常期まで培養した後、<sup>3</sup>H標識グリシンと被験物質を添加し、さらに72時



間培養した。なお、DMEM培地としては、日水製薬社製の『ダルベッコ変法イーグル培地「ニッスイ」②』にグルタミン  $4\text{ mmol/L}$ 、炭酸水素ナトリウム 適量、HEPES  $10\text{ mmol/L}$ 、ペニシリンGカリウム  $50\text{ U/ml}$ 、ストレプトマイシン  $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、牛胎児血清  $10\%$ となるように添加したものをを用いた。

得られた培養液に、 $500\text{ }\mu\text{mol/L}$  フェニルメタンスルホニルフルオリド (PMSF) を添加した後、細胞および培地を回収し、ソニケーターで破碎してタンパク質を抽出した。

該抽出液に  $100\text{ }\mu\text{mol/L}$  ウシ血清アルブミン (BSA) および  $10\%$  トリクロル酢酸 (TCA) を添加した後、 $3000\text{ rpm}$  で5分間遠心分離し、沈殿物を回収した。

該沈殿物に、上記で行った培養で用いた培養容器の底面積  $1\text{ cm}^2$  あたり  $8\text{ }\mu\text{l}$  となるように、 $0.2\text{ mol/L}$  NaOHを加え溶解後、等容量の  $1\text{ mol/L}$  リン酸バッファーで中和した。

得られたタンパク質溶液  $100\text{ }\mu\text{l}$  に、 $25\text{ mmol/L}$  塩化カルシウム  $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ 、 $62.5\text{ mmol/L}$  N-エチルマレイミド  $20\text{ }\mu\text{mol/L}$ 、コラゲナーゼ (和光純薬工業社製; コラーゲン分析用)  $20\text{ unit}$  を加え、 $37^\circ\text{C}$  で90分間反応を行った。

該反応液を分子量  $10,000$  の限外ろ過で分離し、ろ過液のタンパク質画分の放射活性 (CDP) を測定し、新たに合成されたコラーゲンとした。ろ過されなかったタンパク質画分の放射活性 (NCDP) を測定し、下記、式1に従ってコラーゲン合成比を算出した。

相対コラーゲン合成促進活性 (コラーゲン合成の変化) は、コントロールに対する被験物質のコラーゲン合成比の相対値として、下記、式2に従って算出した。

(式1)

$$\text{コラーゲン合成比} = \frac{\text{CDP}}{\text{CDP} + \text{NCDP}}$$

(式2)

$$\text{相対コラーゲン合成促進活性 (\%)} = \frac{\text{被験物質のコラーゲン合成比}}{\text{コントロールのコラーゲン合成比}} \times 100$$

結果を第2表に示した。

Hyp、N-Acetyl-Hypのいずれにもコラーゲンの合成促進活性が認められた。

第2表 コラーゲン合成促進活性

被験物質	0mM	0.1mM	1mM
Hyp	100	108.3	117.1
N-Acetyl-Hyp	100	121.1	119.7

#### 実施例10 ヒト表皮細胞における増殖活性

ヒト表皮細胞の増殖活性の測定は、〔3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide〕 (MTT) を細胞に取り込ませて、生成されるMTTフォルマザン(MTT formazan)量を570nm (リファレンス=650nm) の波長で比色定量するMTT法 (細胞培養III、4477-4482, (1984)) に準じて行った。

即ち、ヒト新生児由来正常表皮角化細胞 (三光純薬社製) を、KGM培地 (三光純薬) で37℃、5%CO<sub>2</sub>下で定常期まで培養し、HypおよびN-Acetyl-Hypを添加し、4日間培養した。ついでMTT試薬を5mg/ml濃度

でリン酸緩衝液（pH 7.4、カルシウム-マグネシウムフリー）に溶解したものを培養液に1/10量添加し、さらに5%CO<sub>2</sub>下、37°Cで4時間培養した。培地を除去後、細胞中のMTTフォルマザンを0.4mol/Lの塩酸を含むイソプロパノールで抽出し、630nmを対照とする570nmにおける吸光度を測定した。

結果を第3表に示した。

Hyp、N-Acetyl-Hypのいずれにも表皮細胞増殖活性が認められた。Hypにおいては濃度依存的な増殖活性が認められた。

第3表 表皮細胞増殖活性

被験物質	0mM	10mM	100mM
Hyp	100	111.6	135.1
N-Acetyl-Hyp	100	108.7	85.9

#### 実施例11 マウス表皮細胞における増殖活性

3日令C3Hマウスより、谷垣らの方法〔日皮会誌、1145-1152（1989）〕に準じて表皮細胞を剥離した。

該表皮細胞を0.25%トリプシンで処理した後、1500rpmで5分間遠心分離し、細胞を取得した。該細胞を10%牛胎児血清を添加したDMEM培地に播種し、37°Cで1日培養しマウス表皮細胞を調製した。

該マウス表皮細胞を、被験物質（HypまたはN-Acetyl-Hyp）入りの無血清MCDB153培地で6日間培養した後、MTT試薬を5mg/ml濃度でリン酸緩衝液（pH 7.4、カルシウム-マグネシウムフリー）に溶解したものを培養液に1/10量添加し、さらに5%CO<sub>2</sub>下、37°Cで4時間培養した。培地を除去後、細胞中のMTTフォルマザンを0.4mol/Lの塩酸を含むイソプロパノールで抽出し、630nmを対照とする570nmにおける吸光

度を測定した。

結果を第4表に示した。

Hyp、N-Acetyl-Hypのいずれにも表皮増殖活性が認められた。

第4表 表皮細胞増殖活性

被験物質	0 $\mu$ M	1 $\mu$ M	3 $\mu$ M	10 $\mu$ M
Hyp	100	88.6	107.5	126
N-Acetyl-Hyp	100	110.7	118.2	121.9

#### 実施例12 水分保持機能の評価(1)

実施例1～8で調製した化粧品(1)～(8)の肌質改善効果を見るため、連用による水分維持機能の変化を調べた。

##### (試験方法)

23～28才の健常な女性4名をパネラーとし、毎日、朝・夕2回、3週間または2ヶ月にわたって、前腕屈曲部の被検部位に被検化粧品を2  $\mu$  l /  $\text{cm}^2$  ずつ塗布した。

##### (評価方法)

経時的に、朝の塗布前の被検部位の水分含量を測定した。測定機器は、SKICON-200〔アイ・ビー・エス社製〕を用い、プローブを被検部位に垂直にあてて肌伝導度(=水分含量)を測定した。

測定値が高いほど水分含量が高いことを示す。被検部位の肌の伝導度変化(相対伝導度)は、無処理部位の伝導度変化に対する相対値として、下記、式3に従って算出した。

(式 3)

$$\text{相対伝導度 (\%)} = \frac{\text{被検部位の各日伝導度}}{\text{被検部位の0日伝導度}} \div \frac{\text{無処理部位の各日伝導度}}{\text{無処理部位の0日伝導度}} \times 100$$

結果を、第5-1表および第5-2表に示した。

Hyp、N-Acetyl-Hypいずれも、連用することにより肌の水分含量が増加し水分維持機能の改善が認められた。またN-Acetyl-Hypはコラーゲンを上回る改善効果を有していた。

第5-1表 水分維持機能の改善

被験物質	相対伝導度 (%)				
	0日後	14日後	28日後	42日後	56日後
精製水	100	96.9	94.5	88.7	93.8
化粧品(1)	100	125.2	119.8	111.1	109.6
化粧品(2)	100	127.5	118.2	108.6	110.3
化粧品(3)	100	238.2	226.9	233.5	186.3
化粧品(4)	100	133.3	134.5	130.8	121.5
化粧品(5)	100	157.8	124.6	132.4	127

第5-2表 水分維持機能の改善

被験物質	相対伝導度 (%)				
	0日後	5日後	9日後	16日後	21日後
精製水	100	96.9	94.5	88.7	93.8
化粧品(4)	100	104.3	129.9	115.3	136.8
化粧品(6)	100	120.9	144.3	140.6	172
化粧品(7)	100	108.3	150.2	123.3	145.2
化粧品(8)	100	117	145.7	185.9	146.1

### 実施例 1 3 水分維持機能の評価 (2)

N-Acetyl-Hypの水分維持効果について単回処理による濃度依存性を評価した。

#### (試験方法)

23～32才の健常な女性12名をパネルとし、前腕屈曲部の被検部位の水分含量を測定した後、被験物質を $2\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ずつ塗布し放置した。

3時間後に測定し、塗布前の水分含量を100%とした相対値で評価した。

結果を第6表に示した。N-Acetyl-Hypは単回処理でも濃度依存的な水分維持効果を示した。

第6表 N-Acetyl-Hypの水分維持機能

	精製水	N-Acetyl-Hyp			
		1%	3%	5%	10%
相対伝導度 (%)	91	100	129	186	189

### 実施例 1 4 肌質改善効果

実施例 1 2の実施時に、パネラーの被験部位のシリコンレプリカ〔商品名「スキンキャスト」使用、山田粧業社製〕を作製し、下記基準により肌状態のスコアを求め肌質改善効果を評価した。

#### 肌状態スコア：

スコア1：肌の皮溝が不鮮明であり、はがれた角質が認められる。

スコア2：肌の皮溝がやや不鮮明であるかまたは一方向性が強い。

スコア3：肌の皮溝は認められるが、浅いかまたは一方向性が強い。

スコア4：肌の皮溝が認められるかまたはやや網目状である。

スコア5：肌の皮溝がはっきり認められるかまたはきれいな網目状である。

結果を第7表に示した。精製水塗布部位に比べ、化粧料(1)～(5)のスコアは0.4～2.1上昇しており、明らかに肌質の改善が見られた。即ち、きめ細かな肌となり、しわ形成の抑制もしくは改善効果が認められた。また、

レシチンを配合した化粧品（５）は、配合していない化粧品（１）に比べスコアが高く、使用感も高まる結果が得られた。

第７表 スコア

被験物質	スコア
精製水	2.3
化粧品(1)	3.7
化粧品(2)	2.8
化粧品(3)	4.4
化粧品(4)	3.8
化粧品(5)	3.6

以上、本発明の肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤並びに化粧品は、表皮細胞の増殖促進作用、繊維芽細胞のコラーゲン合成促進作用、表皮の水分保持機能向上作用、しわ形成抑制もしくは改善作用等を有することから、肌の老化抑制および／または肌質改善等に有効であることが確認された。

#### 産業上の利用可能性

本発明によれば、肌の老化抑制作用および／または肌質改善剤作用等に有効である肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤を提供することができる。本発明によれば、肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤からなる肌の老化抑制および／または肌質改善用化粧料を提供することができる。本発明によれば、ヒドロキシプロリンもしくはヒドロキシプロリンのN-アシル誘導体またはその塩を有効成分とする肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤を肌に塗布することからなる肌の老化抑制および／または肌質改善方法を提供することができる。本発明によれば、ヒドロキシプロリンもしくはヒドロキシプロリンのN

ーアシル誘導体またはその塩を含有する肌の老化抑制および／または肌質改善化粧料を肌に塗布することからなる肌の老化抑制および／または肌質改善方法を提供することができる。本発明によれば、肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤を製造するためのヒドロキシプロリンもしくはヒドロキシプロリンのNーアシル誘導体またはその塩の使用を提供することができる。本発明によれば、肌の老化抑制および／または肌質改善化粧料を製造するためのヒドロキシプロリンもしくはヒドロキシプロリンのNーアシル誘導体またはその塩の使用を提供することができる。本発明によれば、肌の老化抑制および／または肌質改善のためのヒドロキシプロリンもしくはヒドロキシプロリンのNーアシル誘導体またはその塩の使用を提供することができる。



## 請求の範囲

1. ヒドロキシプロリンもしくはヒドロキシプロリンのN-アシル誘導体またはその塩を有効成分とする肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤。
2. ヒドロキシプロリンまたはヒドロキシプロリンのN-アシル誘導体を全重量に対し0.01～5重量%含有することを特徴とする、請求の範囲1記載の肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤。
3. ヒドロキシプロリンのN-アシル誘導体が、N-アセチル化誘導体またはN-プロピオニル化誘導体である、請求の範囲1または2記載の肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤。
4. ヒドロキシプロリンが、シス-4-ヒドロキシ-L-プロリン、シス-4-ヒドロキシ-D-プロリン、シス-3-ヒドロキシ-L-プロリン、シス-3-ヒドロキシ-D-プロリン、トランス-4-ヒドロキシ-L-プロリン、トランス-4-ヒドロキシ-D-プロリン、トランス-3-ヒドロキシ-L-プロリンおよびトランス-3-ヒドロキシ-D-プロリンからなる群より選ばれるヒドロキシプロリンである、請求の範囲1～3記載いずれかに記載の肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤。
5. ヒドロキシプロリンが、微生物により生産されたヒドロキシプロリンである、請求の範囲1～4いずれかに記載の肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤。
6. 微生物が、アミコラトプシス属、ダクチロスポランジウム属およびストレプトマイセス属から選ばれる属に属する微生物由来のプロリン3位水酸化酵素またはプロリン4位水酸化酵素遺伝子を導入された微生物である、請求の範囲5記載の肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤。
7. 肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤が、表皮細胞の増殖促進剤である請求の範囲1～6のいずれかに記載の肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤。

8. 肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤が、繊維芽細胞のコラーゲン合成促進剤である請求の範囲 1～6 のいずれかに記載の肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤。

9. 肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤が、表皮の水分保持機能向上剤である請求の範囲 1～6 のいずれかに記載の肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤。

10. 肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤が、しわ形成抑制または改善剤である請求の範囲 1～6 のいずれかに記載の肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤。

11. 肌がヒトの肌である請求の範囲 1～10 のいずれかに記載の肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤。

12. 請求の範囲 1～11 のいずれかに記載の肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤を含有する肌の老化抑制および／または肌質改善化粧料。

13. ヒドロキシプロリンもしくはヒドロキシプロリンのN-アシル誘導体またはその塩が、N-アセチルヒドロキシプロリンまたはその塩である請求の範囲 12 記載の化粧料。

14. 化粧料にレシチン、リゾレシチンおよびヒアルロン酸からなる群より選ばれる一種又は二種以上の成分を含有する請求の範囲 12 または 13 記載の化粧料。

15. ヒドロキシプロリンもしくはヒドロキシプロリンのN-アシル誘導体またはその塩を有効成分とする肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤を肌に塗布することからなる肌の老化抑制および／または肌質改善方法。

16. 肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤中にヒドロキシプロリンまたはヒドロキシプロリンのN-アシル誘導体を 0.01～5 重量%含有する請求項 15 記載の肌の老化抑制および／または肌質改善方法。

17. ヒドロキシプロリンのN-アシル誘導体が、N-アセチル化誘導

体またはN-プロピオニル化誘導体である、請求項15または16記載の肌の老化抑制および／または肌質改善方法。

18. ヒドロキシプロリンが、シス-4-ヒドロキシ-L-プロリン、シス-4-ヒドロキシ-D-プロリン、シス-3-ヒドロキシ-L-プロリン、シス-3-ヒドロキシ-D-プロリン、トランス-4-ヒドロキシ-L-プロリン、トランス-4-ヒドロキシ-D-プロリン、トランス-3-ヒドロキシ-L-プロリンおよびトランス-3-ヒドロキシ-D-プロリンからなる群より選ばれるヒドロキシプロリンである、請求項15～17記載いずれかに記載の肌の老化抑制および／または肌質改善方法。

19. ヒドロキシプロリンが、微生物により生産されたヒドロキシプロリンである、請求項15～18いずれかに記載の肌の老化抑制および／または肌質改善方法。

20. 微生物が、アミコラトプシス属、ダクチロスポランジウム属およびストレプトマイセス属から選ばれる属に属する微生物由来のプロリン3位水酸化酵素またはプロリン4位水酸化酵素遺伝子を導入された微生物である、請求項19. 記載の肌の老化抑制および／または肌質改善方法。

21. 肌の老化抑制および／または肌質改善方法が、表皮細胞の増殖促進方法である請求項15～20のいずれかに記載の肌の老化抑制および／または肌質改善方法。

22. 肌の老化抑制および／または肌質改善方法が、繊維芽細胞のコラーゲン合成促進方法である請求項15～20のいずれかに記載の肌の老化抑制および／または肌質改善方法。

23. 肌の老化抑制および／または肌質改善方法が、表皮の水分保持機能向上方法である請求項15～20のいずれかに記載の肌の老化抑制および／または肌質改善方法。

24. 肌の老化抑制および／または肌質改善方法が、しわ形成抑制また

は改善方法である請求項 15～20 のいずれかに記載の肌の老化抑制および／または肌質改善方法。

25. 肌がヒトの肌である請求項 15～24 のいずれかに記載の肌の老化抑制および／または肌質改善方法。

26. ヒドロキシプロリンもしくはヒドロキシプロリンのN-アシル誘導体またはその塩を含有する肌の老化抑制および／または肌質改善化粧料を肌に塗布することからなる肌の老化抑制および／または肌質改善方法。

27. 肌の老化抑制および／または肌質改善化粧料中にヒドロキシプロリンまたはヒドロキシプロリンのN-アシル誘導体を0.01～5重量%含有する請求項 26 記載の肌の老化抑制および／または肌質改善方法。

28. ヒドロキシプロリンのN-アシル誘導体が、N-アセチル化誘導体またはN-プロピオニル化誘導体である、請求項 26 または 27 記載の肌の老化抑制および／または肌質改善方法。

29. ヒドロキシプロリンが、シス-4-ヒドロキシ-L-プロリン、シス-4-ヒドロキシ-D-プロリン、シス-3-ヒドロキシ-L-プロリン、シス-3-ヒドロキシ-D-プロリン、トランス-4-ヒドロキシ-L-プロリン、トランス-4-ヒドロキシ-D-プロリン、トランス-3-ヒドロキシ-L-プロリンおよびトランス-3-ヒドロキシ-D-プロリンからなる群より選ばれるヒドロキシプロリンである、請求項 26～28 記載いずれかに記載の肌の老化抑制および／または肌質改善方法。

30. ヒドロキシプロリンが、微生物により生産されたヒドロキシプロリンである、請求項 26～29 いずれかに記載の肌の老化抑制および／または肌質改善方法。

31. 微生物が、アミコラトプシス属、ダクチロスポランジウム属およびストレプトマイセス属から選ばれる属に属する微生物由来のプロリン3位水酸化酵素またはプロリン4位水酸化酵素遺伝子を導入された微生物である、請

求項 30 記載の肌の老化抑制および／または肌質改善方法。

32. 肌の老化抑制および／または肌質改善方法が、表皮細胞の増殖促進方法である請求項 26～31 のいずれかに記載の肌の老化抑制および／または肌質改善方法。

33. 肌の老化抑制および／または肌質改善方法が、繊維芽細胞のコラーゲン合成促進方法である請求項 26～31 のいずれかに記載の肌の老化抑制および／または肌質改善方法。

34. 肌の老化抑制および／または肌質改善方法が、表皮の水分保持機能向上方法である請求項 26～31 のいずれかに記載の肌の老化抑制および／または肌質改善方法。

35. 肌の老化抑制および／または肌質改善方法が、しわ形成抑制または改善方法である請求項 26～31 のいずれかに記載の肌の老化抑制および／または肌質改善方法。

36. 肌がヒトの肌である請求項 26～35 のいずれかに記載の肌の老化抑制および／または肌質改善方法。

37. 肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤を製造するためのヒドロキシプロリンもしくはヒドロキシプロリンの N-アシル誘導体またはその塩の使用。

38. 肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤中にヒドロキシプロリンまたはヒドロキシプロリンの N-アシル誘導体を 0.01～5 重量%含有する請求項 37 記載の使用。

39. ヒドロキシプロリンの N-アシル誘導体が、N-アセチル化誘導体または N-プロピオニル化誘導体である、請求項 37 または 38 記載の使用。

40. ヒドロキシプロリンが、シス-4-ヒドロキシ-L-プロリン、シス-4-ヒドロキシ-D-プロリン、シス-3-ヒドロキシ-L-プロリン、シス-3-ヒドロキシ-D-プロリン、トランス-4-ヒドロキシ-L-プロ

リン、トランス-4-ヒドロキシ-D-プロリン、トランス-3-ヒドロキシ-L-プロリンおよびトランス-3-ヒドロキシ-D-プロリンからなる群より選ばれるヒドロキシプロリンである、請求項37~39のいずれかに記載の使用。

41. ヒドロキシプロリンが、微生物により生産されたヒドロキシプロリンである、請求項37~40のいずれかに記載の使用。

42. 微生物が、アミコラトプシス属、ダクチロスポランジウム属およびストレプトマイセス属から選ばれる属に属する微生物由来のプロリン3位水酸化酵素またはプロリン4位水酸化酵素遺伝子を導入された微生物である、請求項41記載の使用。

43. 肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤が、表皮細胞の増殖促進剤である請求項37~42のいずれかに記載の使用。

44. 肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤が、繊維芽細胞のコラーゲン合成促進剤である請求項37~42のいずれかに記載の使用。

45. 肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤が、表皮の水分保持機能向上剤である請求項37~42のいずれかに記載の使用。

46. 肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤が、しわ形成抑制剤または改善剤である請求項37~42のいずれかに記載の使用。

47. 肌がヒトの肌である請求項37~46のいずれかに記載の使用。

48. 肌の老化抑制および／または肌質改善用化粧料を製造するためのヒドロキシプロリンもしくはヒドロキシプロリンのN-アシル誘導体またはその塩の使用。

49. ヒ肌の老化抑制および／または肌質改善用化粧料中にヒドロキシプロリンまたはヒドロキシプロリンのN-アシル誘導体を0.01~5重量%含有する請求項48記載の使用。

50. ヒドロキシプロリンのN-アシル誘導体が、N-アセチル化誘導

体またはN-プロピオニル化誘導体である、請求項48または49記載の使用。

51. ヒドロキシプロリンが、シス-4-ヒドロキシ-L-プロリン、シス-4-ヒドロキシ-D-プロリン、シス-3-ヒドロキシ-L-プロリン、シス-3-ヒドロキシ-D-プロリン、トランス-4-ヒドロキシ-L-プロリン、トランス-4-ヒドロキシ-D-プロリン、トランス-3-ヒドロキシ-L-プロリンおよびトランス-3-ヒドロキシ-D-プロリンからなる群より選ばれるヒドロキシプロリンである、請求項48~50のいずれかに記載の使用。

52. ヒドロキシプロリンが、微生物により生産されたヒドロキシプロリンである、請求項48~51のいずれかに記載の使用。

53. 微生物が、アミコラトプシス属、ダクチロスポランジウム属およびストレプトマイセス属から選ばれる属に属する微生物由来のプロリン3位水酸化酵素またはプロリン4位水酸化酵素遺伝子を導入された微生物である、請求項52記載の使用。

54. 肌の老化抑制および／または肌質改善が、表皮細胞の増殖促進である請求項48~53のいずれかに記載の使用。

55. 肌の老化抑制および／または肌質改善が、繊維芽細胞のコラーゲン合成促進である請求項48~53のいずれかに記載の使用。

56. 肌の老化抑制および／または肌質改善が、表皮の水分保持機能向上である請求項48~53のいずれかに記載の使用。

57. 肌の老化抑制および／または肌質改善が、しわ形成抑制剤または改善剤である請求項48~53のいずれかに記載の使用。

58. 肌がヒトの肌である請求項48~57のいずれかに記載の使用。

59. 肌の老化抑制および／または肌質改善のためのヒドロキシプロリンもしくはヒドロキシプロリンのN-アシル誘導体またはその塩の使用。

60. ヒドロキシプロリンのN-アシル誘導体が、N-アセチル化誘導

体またはN-プロビオニル化誘導体である、請求項59記載の使用。

61. ヒドロキシプロリンが、シス-4-ヒドロキシー-L-プロリン、シス-4-ヒドロキシー-D-プロリン、シス-3-ヒドロキシー-L-プロリン、シス-3-ヒドロキシー-D-プロリン、トランス-4-ヒドロキシー-L-プロリン、トランス-4-ヒドロキシー-D-プロリン、トランス-3-ヒドロキシー-L-プロリンおよびトランス-3-ヒドロキシー-D-プロリンからなる群より選ばれるヒドロキシプロリンである、請求項59または60に記載の使用。

62. ヒドロキシプロリンが、微生物により生産されたヒドロキシプロリンである、請求項59～61のいずれかに記載の使用。

63. 微生物が、アミコラトプシス属、ダクチロスボランジウム属およびストレプトマイセス属から選ばれる属に属する微生物由来のプロリン3位水酸化酵素またはプロリン4位水酸化酵素遺伝子を導入された微生物である、請求項62記載の使用。

64. 肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤が、表皮細胞の増殖促進剤である請求項59～63のいずれかに記載の使用。

65. 肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤が、繊維芽細胞のコラーゲン合成促進剤である請求項59～63のいずれかに記載の使用。

66. 肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤が、表皮の水分保持機能向上剤である請求項59～63のいずれかに記載の使用。

67. 肌の老化抑制剤および／または肌質改善剤が、しわ形成抑制剤または改善剤である請求項59～63のいずれかに記載の使用。

68. 肌がヒトの肌である請求項59～67のいずれかに記載の使用。



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01203

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>7</sup> A61K 7/48, 7/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K 7/00-7/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CA(STN), WPIDS(STN), REGISTRY(STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 1-131107, A (ETAB. GIVAUDAN LA VIROTTE & CO.), 24 May, 1989 (24.05.89), Claims; page 2; upper right column; lines 13 to 16; page 3; lower left column; lines 1 to 4; examples 5 to 10 & EP, 308278, A1 & FR, 2619711, A	1-4, 11-13, 15-18, 25-29, 36-40, 47-51, 58-61, 68
Y		7-10, 14, 21-24, 32-35, 43-46, 54-57, 64-67
X	JP, 6-199650, A (AJINOMOTO CO., INC.), 19 July, 1994 (19.07.94), Claims; page 2; Par. No. [0001]; example 1 (Family: none)	1, 2, 9, 11-12, 15, 16, 23, 25-27, 34, 36-38, 45, 47-49, 56, 58, 59, 66
Y		1, 2, 4, 8, 9, 11, 12, 15, 16, 18, 22, 23, 25-27, 29, 33, 34, 36-38, 40, 44, 45, 47-49, 51, 55, 56, 58, 59, 61, 65, 66, 68

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
29 March, 2000 (29.03.00)Date of mailing of the international search report  
11.04.00Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01203

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP, 864563, A1 (HAARMANN & REIMER GMBH), 16 September, 1998 (16.09.98), specification, & JP, 10-259175, A & DE, 19710612, A	1-4, 9, 11-18, 23 , 25-29, 34, 36- 40, 45, 47-51, 56, 58-61, 66, 68
Y	GB, 2151924, A (Roussel-Uclaf), 31 July, 1985 (31.07.85), page 1; lines 11 to 23, 50 to 53 & JP, 60-214722, A & DE, 3447618, A & FR, 2557452, A & US, 4702913, A & US, 4814171, A	1-4, 7-18, 21-29, 32-40, 43-51, 54-61, 64-68
Y	JP, 9-255552, A (Shiseido Company, Limited. ), 30 September, 1997 (30.09.97), page 2; Par. Nos. [0002] to [0003] (Family: none)	1-4, 7-18, 21-29, 32-40, 43-51, 54-61, 64-68
Y	JP, 11-49628, A (Shiseido Company, Limited. ), 23 February, 1999 (23.02.99), page 2; Par. Nos. [0004] to [0005] (Family: none)	1-4, 7-18, 21-29, 32-40, 43-51, 54-61, 64-68
Y	JP, 7-313179, A (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.), 05 December, 1995 (05.12.95), Claims (Family: none)	5, 6, 19, 20, 30, 31, 41, 42, 52, 53 , 62, 63
Y	JP, 7-322885, A (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.), 12 December, 1995 (12.12.95), Claims (Family: none)	5, 6, 19, 20, 30, 31, 41, 42, 52, 53, 62, 63

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. A61K 7/48, 7/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. A61K 7/00-7/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA(STN), WPIDS(STN), REGISTRY(STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 1-131107, A (レ・エタブリスマン・ジボダン・ラビロツト・エ・コンパニ), 24. 5月. 1989 (24. 05. 89), 特許請求の範囲、第2頁, 右上欄, 第13-16行、第3頁, 左下欄, 第1-4行、実施例5-10	1-4, 11-13, 15-18, 25-29, 36-40, 47-51, 58-61, 68
Y	& EP, 308278, A1 & FR, 2619711, A	7-10, 14, 21-24, 32-35, 43-46, 54-57, 64-67

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献  
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29. 03. 00

国際調査報告の発送日

11.04.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高原 慎太郎

4C

9053

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

## C (続き). 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 6-199650, A (味の素株式会社), 19. 7月. 1994 (19. 07. 94), 特許請求の範囲、第2頁、段落【0001】、 実施例1 (ファミリーなし)	1, 2, 9, 11- 12, 15, 16, 23, 25-27, 34, 36-38, 45, 47-49, 56, 58, 59, 66
Y	JP, 5-59075, A (昭和電工株式会社), 9. 3月. 1993 (09. 03. 93), 第2頁, 第2欄, 第15-20行、第4頁, 第6欄, 第10-11行 (ファミリーなし)	1, 2, 4, 8, 9, 11, 12, 15, 16, 18, 22, 23, 25-27, 29, 33, 34, 36-38, 40, 44, 45, 47- 49, 51, 55, 56, 58, 59, 61, 65, 66, 68
Y	EP, 864563, A1 (HAARMANN & REIMER GMBH), 1 6. 9月. 1998 (16. 09. 98), 明細書全体 & JP, 10-259175, A & DE, 19710612, A	1-4, 9, 11- 18, 23, 25- 29, 34, 36- 40, 45, 47- 51, 56, 58- 61, 66, 68
Y	GB, 2151924, A (Roussel-Uclaf), 31. 7月. 1985 (31. 07. 85), 第1頁, 第11-23行, 第50-53行 & JP, 60-214722, A & DE, 3447618, A & FR, 2557452, A & US, 4702913, A & US, 4814171, A	1-4, 7-18, 21-29, 32- 40, 43-51, 54-61, 64- 68
Y	JP, 9-255552, A (株式会社資生堂), 30. 9月. 1997 (30. 09. 97), 第2頁, 段落【0002】-【0003】 (ファミリーなし)	1-4, 7-18, 21-29, 32- 40, 43-51, 54-61, 64- 68
Y	JP, 11-49628, A (株式会社資生堂), 23. 2月. 1999 (23. 02. 99), 第2頁, 段落【0004】-【0005】 (ファミリーなし)	1-4, 7-18, 21-29, 32- 40, 43-51, 54-61, 64- 68
Y	JP, 7-313179, A (協和醗酵工業株式会社), 5. 12月. 1 995 (05. 12. 95), 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	5, 6, 19, 2 0, 30, 31, 41, 42, 52, 53, 62, 63
Y	JP, 7-322885, A (協和醗酵工業株式会社), 12. 12月. 1995 (12. 12. 95), 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	5, 6, 19, 2 0, 30, 31, 41, 42, 52, 53, 62, 63

第V欄 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、  
それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	1-6	有 無
	請求の範囲		
進歩性 (IS)	請求の範囲	1-6	有 無
	請求の範囲		
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1-6	有 無
	請求の範囲		

## 2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

文献 1) JP 11-130669 A  
2) JP 10-175857 A

請求の範囲 1-6 の発明は、新規性及び進歩性を有する。国際調査報告で引用された文献 1, 2 には、ヒドロキシプロリンのN-アシル化誘導体又はその塩が褥瘡の予防や治療に用い得ることについて、記載も示唆もされていない。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**